

**Doktori értekezés tézisei**

**A PROTEIN KINÁZ D SZEREPE AZ IDEGSEJTEK  
TRANSZPORTFOLYAMATAIBAN ÉS A DENDRITFA  
FENNTARTÁSÁBAN**

**Czöndör Katalin**

**Témavezető: Dr. Schlett Katalin**

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Erdei Anna

Idegtudomány és Humánbiológia Doktori Program

Programvezető: Dr. Détári László

**ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék**

**Budapest**

**2009**

## **Bevezetés**

A protein kináz D (PKD) a szerin-treonin kinázok egy nemrég elkülönített, önálló családja (Van Lint és mtsai., 2002). Az eddigi, nem-neurális sejteken végzett vizsgálatok alapján a PKD mindhárom izoformája (PKD1, PKD2 és PKD3) rendkívül szerteágazó hatással bír: szerepüket különböző immunrendszeri folyamatokban, sejtostodás, sejtvándorlás és programozott sejthalál alatt is kimutatták (Rykx és mtsai., 2003). A PKD molekulák egy része a Golgi készülékhez kötötten található, ahol a plazmamembrán irányába szállítandó vezikulák lefűződésében vesz részt (Liljedahl és mtsai., 2001). Polarizált sejtekben emellett azt is kimutatták, hogy a PKD kizárólag a bazolaterális irányú fehérjetranszportban játszik szerepet (Yeaman és mtsai., 2004).

Egerek központi idegrendszerében a PKD mindhárom izoformája már korai embrionális korban expresszáldódik (Oster és mtsai, 2006), a PKD idegsejtekben betöltött szerepéről azonban nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre. Mivel az idegsejtek kiemelkedő mértékű polarizáltságának és a rendkívül kiterjedt nyúlványrendszerének fenntartásához szigorúan szabályozott, nagy kapacitású transzportfolyamatokra van szükség, feltételezhető, hogy a Golgi készüléknél lokalizálódó PKD az idegsejtek plazmamembrán irányú transzportfolyamatainak fenntartásában is fontos szerepet játszik. A közelmúltban megjelent közlemények alapján a PKD a dendritnövekedés szabályozásában (Ehlers és mtsai, 2005) és a dendritikus membránfehérjék irányított szállításában is részt vesz (Bisbal és mtsai, 2008). A PKD által irányított folyamatok jelentősége az idegsejtek polarizáltságának fenntartásában és működésében azonban még messze nem tisztázott.

## **Célkitűzések**

Kísérleteink során egér embrionális hippocampális idegsejt-tenyészetek felhasználásával vizsgáltuk a PKD szerepét az idegsejtek működésében. Elemzéseink során különböző, fluoreszcensen jelzett fehérjék túltermeltetésének hatását vizsgáltuk. Kísérleteink során a következő célokat tűztük ki:

1. Fluoreszcensen jelzett, a PKD aktivitást detektáló konstrukció segítségével az endogén PKD aktivitás eloszlásának vizsgálata idegsejtek fejlődése során.
2. Kolokalizációs vizsgálatokkal fluoreszcensen jelzett vad típusú és mutáns PKD fehérjék intracelluláris eloszlásának és lehetséges kölcsönhatásainak felderítése érett idegsejtekben.

3. A PKD Golgi készülék morfológiájára és a dendritikus arborizációra gyakorolt hatásának tanulmányozása kináz inaktív és konstitutív aktív PKD mutánsok túltermeltetésének segítségével.

4. A PKD axonális szállításának, illetve más axonális fehérjék szállítására gyakorolt hatásának elemzése gyors live cell imaging kísérletekkel.

### **Alkalmazott módszerek**

- primér hippocampális idegsejt-tenyészetek készítése és fenntartása
- fluoreszcensen jelzett vad típusú és mutáns PKD fehérjék, különböző dendritikus és axonális fehérjék expresszálsa primér hippocampális idegsejtenyészetekben Lipofectamine alapú transzfekció során
- immuncitokémiai festés fixált primér hippocampális idegsejtekben
- mikroszkópos elemzések

Morfológiai elemzés:

- *Golgi morfológia* elemzése különbözően transzfektált hippocampális idegsejtekben.
- *Dendritikus arborizáció* kvantitatív elemzése különbözően transzfektált hippocampális idegsejtekben.

Intracelluláris lokalizáció:

- *Endogén PKD aktivitás* eloszlásának vizsgálata egy PKD által specifikusan foszforilálódó, a PKD aktivitást detektáló konstrukció segítségével.
- Különböző, fluoreszcensen jelzett dendritikus fehérjék eloszlásának összehasonlítása eltérő PKD mutánsok *kotranszfekciója* során.

Live cell imaging:

- Túltermeltetett, fluoreszcensen jelzett fehérjék mobilitásának elemzése *FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)* vizsgálattal.
- Különböző típusú axonális transzportok vizsgálata *kettős fluoreszcens, gyors live cell imaging* segítségével.
- Intracelluláris eloszlásban fellépő változások követése PKD aktiválása során.

## **Eredmények (tézisek)**

### **1. Az endogén PKD aktivitás az idegsejtek fejlődése során polarizált eloszlást mutat**

Az endogén PKD aktivitásának kimutatásához a hippokampális idegsejteket EGFP-rel jelzett, a PKD aktivitást detektáló konstrukcióval transzfektáltuk. A PKD aktivitását foszfor-specifikus ellenanyaggal mutattuk ki, amely a konstrukcióban lokalizált PKD-target foszforilált szerinjét ismer fel.

A fiatal idegsejtekben a PKD aktivitás egyöntetűen kimutatható volt mind a sejttestben, mind az összes nyúlványban, míg az idegsejtek fejlődésével párhuzamosan az aktivitás az axonból eltűnt. Érett idegsejtekben a PKD aktivitást detektáló konstrukció foszforilációja csak a szomatodendritikus részekben volt megfigyelhető, az axonban ez hiányzott.

Továbbá megmutattuk - olyan endogén PKD aktivitást detektáló konstrukció segítségével, amely a Golgi készülékhez való kötődéshez szükséges szekvenciát is tartalmazza - hogy az érett idegsejtekben a Golgi készülékéhez lokalizáltan is magas az endogén PKD aktivitás.

### **2. A vad típusú és mutáns PKD konstrukciók intracelluláris eloszlása érett idegsejtekben különbözik és egyes dendritikus fehérjék eloszlását eltérően befolyásolja**

Vizsgálataink alapján a fluoreszcensen jelzett vad típusú és konstitutív aktív PKD (wtPKD1-EGFP és caPKD1-EGFP) a citoplazmás eloszlás mellett a neurális Golgi készüléknél is felhalmozódott. Ezzel ellentétben a kináz inaktív PKD (kdPKD1-EGFP) expressziója viszonylag alacsony volt a citoplazmában, de a sejtmag körüli területen és a dendritekben kisméretű aggregátumok kialakulásához vezetett. A Golgi készüléknél a kdPKD1-EGFP felhalmozódása a vad típusú és konstitutív aktív PKD-t túltermelő sejtekhez képest jóval kifejezettebb volt. Emellett FRAP vizsgálatok segítségével bizonyítottuk, hogy a kdPKD1-EGFP mobilitása a citoplazmában a vad típusú PKD konstrukcióhoz képest sokkal alacsonyabb.

Emellett az érett idegsejtek fluoreszcensen jelzett PKD konstrukciókkal és különböző dendritikus fehérjékkel történő kotranszfekcióját követő mikroszkópos elemzéseink alapján megállapítottuk, hogy a PKD aktivitás bizonyos dendritikus fehérjék szállítását és/vagy lokalizációját befolyásolhatja. A PKD aktivitásának módosítása a Kv4.2-es ioncsatorna alegység intracelluláris lokalizációjának megváltozásához vezetett, míg a PSD-95 vagy az NMDA receptor 1-es alegységének eloszlására a megnövelt vagy csökkentett PKD aktivitás nem volt hatással.

### **3. A PKD aktivitás az érett idegsejtekben a Golgi struktúráját és a dendritikus arborizációt is szabályozza**

A Golgi készülék morfológiáját EGFP-vel, wtPKD1-EGFP-vel, kdPKD1-EGFP-vel és caPKD1-EGFP-vel transzfektált idegsejtekben vizsgáltuk. Immunfestéssel mind a cisz- mind a transz-Golgi hálózatot megfestettük, az előbbinél GM130, az utóbbinál VAMP4 ellenanyagot használva. A kdPKD1-EGFP-vel transzfektált sejtek nagy részében a Golgi készülék kisebb fragmensekre esett szét, amelyek cisz- és transz-Golgi elemeket egyaránt tartalmaztak. A kdPKD1-EGFP-vel ellentétben a wtPKD1-EGFP és a caPKD1-EGFP expressziója nem befolyásolta a Golgi apparátus fonalas struktúráját. A kdPKD1-EGFP túltermeltetésének hatását három párhuzamos tenyészetből történő kvantitatív elemzés is alátámasztotta: a fragmentált Golgi készüléket tartalmazó transzfektált sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a kdPKD1-EGFP-t expresszáló idegsejtek tenyészeiben, mint a wtPKD1-EGFP-t, caPKD1-EGFP-t vagy EGFP-vel transzfektált tenyészetekben.

A kdPKD1-EGFP túltermeltetés hatásának időbeliségét vizsgálva a Golgi készülék morfológiáját 12, 18 és 24 órával a transzfekció után elemeztük. A fragmentált Golgit tartalmazó transzfektált sejtek aránya a transzfekció után eltelt idővel párhuzamosan nőtt. Mivel a kdPKD1-EGFP átlagos expressziós szintje is arányosan nőtt a transzfekció után eltelt idővel, eredményeink arra utalnak, hogy a Golgi struktúra szétesése és a kdPKD1-EGFP expressziós szintje összefügg.

A PKD dendritmorfológiára és dendritikus átrendeződésre gyakorolt hatását EGFP-vel, wtPKD1-EGFP-vel, kdPKD1-EGFP-vel és caPKD1-EGFP-vel transzfektált idegsejtekben vizsgáltuk. A transzfektált idegsejtek dendritfa-elágazódásának mértékét módosított Sholl elemzéssel vizsgáltuk. Az elemzések alapján a kdPKD1-EGFP túltermeltetése a dendritfa arborizációjának szignifikáns csökkenéséhez, míg a caPKD1-EGFP a dendritfa megnövekedéséhez vezetett az érett idegsejtekben. Ugyanabban a sejtben megvizsgálva a Golgi morfológiát és a dendritikus elágazódás mértékét, a Golgi készülék fragmentálódása és a redukált dendritfa arborizációja között összefüggést találtunk.

### **4. PKD axonális transzportja - live cell imaging megfigyelések**

Annak ellenére, hogy a PKD aktivitása érett idegsejtek axonjában nem volt kimutatható, specifikus ellenanyaggal történő immunfestés alapján a PKD jelen van az axonban. Emellett

gyors live cell imaging felvételek készítésével igazoltuk, hogy a wtPKD1-EGFP asszociált vezikulák mindkét irányban, megtorpanásokkal megszakított mozgási mintázatot mutatva szállítódnak az axonban. Gyors, kettős fluoreszcens live cell imaging mikroszkópia segítségével megmutattuk, hogy a túltermeltetett wtPKD1-EGFP molekulák a gyors komponenssel szállítódó szinaptofizintől és szinaptotagmintól független transzportálódnak. Ezzel ellentétben a wtPKD1-EGFP az ismert, SCb komponenssel szállítódó szinapszinnal és miozin Vb-vel részlegesen együtt transzportálódott. Ezen kívül a wtPKD1-EGFP a preszinaptikus szinukleinnal és szinapszinnal axonális elágazódásokban és axonvégződéseknél lévő mozdulatlan felhalmozódásokban kolokalizált.

A fixált idegsejt-tenyészeteken történő mikroszkópos vizsgálatok megmutatták, hogy a transzfekció utáni idő elteltével - ellentétben a wtPKD1-EGFP-vel - a kdPKD1-EGFP egyre kevésbé detektálható az axonban. A kdPKD1-EGFP asszociált struktúrák live cell imaging vizsgálatok során csak néhány esetben voltak az axonban kimutathatók, és rövid idejű, rendszertelen mozgás jellemezte őket. A kotranszfekciós kísérletekben a kdPKD1-EGFP egyik vizsgált axonális fehérjével sem kolokalizált.

### **Következtetés**

Eredményeink alapján az érett idegsejtekben az endogén PKD aktivitása polarizált, azaz a szomatodendritikus területeken erős aktivitás mutatható ki, az axonban azonban hiányzik. A PKD polarizált aktivitása az idegsejtek érésével párhuzamosan alakult ki, mivel a PKD aktivitást detektáló konstrukció foszforilációja fiatal, nem-polarizált idegsejtekben mindenhol kimutatható. Ez alapján feltételezhető, hogy a PKD az idegsejtek korai fejlődésében is szerepet játszik. Ezt támasztják alá nemrégiben megjelent közlemények is, amelyekben megmutatták, hogy a PKD hozzájárul az idegsejtek korai fejlődése során fellépő polarizációs folyamatokhoz (Watkins és mtsai, 2008; Yin és mtsai, 2008), és szerepet játszik a dendritfejlődésben is (Horton és mtsai, 2005). Előzetes vizsgálataink alapján a PKD az idegsejtek fejlődési folyamatait a nyulványnövekedéshez szükséges membrán komponensek biztosításával vagy a szükséges citoskeletális változások irányításával is befolyásolhatja. A PKD idegsejtek fejlődésében betöltött szerepének feltárásához azonban még további kísérletek szükségesek.

Annak ellenére, hogy az endogén PKD aktivitás nem mutatható ki az érett idegsejtek axonjában, immuncitokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a PKD az axonban is jelen van. Emellett live cell imaging felvételekkel a PKD axonális transzportját is detektáltuk, jelezve,

hogy a PKD-nak szerep lehet axonális folyamatokban is. A wtPKD1-EGFP axonális szállításának jellemzői alapján a PKD SCb típusú transzporttal szállítódik az axonban, amit alátámaszt az is, hogy a wtPKD1-EGFP asszociált struktúrák részben együtt mozogtak ismert SCb komponens fehérjékkel. A wtPKD1-EGFP-vel ellentétben a kdPKD1-EGFP a transzfekciót követő idő előrehaladtával eltűnt az axonból, ami arra utal, hogy a PKD szállítása az axonban a PKD aktivitásától függ. Mivel az endogén PKD inaktív az axonban, a kináz aktivitás feltehetőleg a motorfehérjékhez való direkt vagy adaptor fehérjéken keresztüli kapcsolódáshoz szükséges. Ismert, hogy a PKD C-terminusán lévő szerin (auto)foszforilációja a fehérjék közötti, PDZ doménokon keresztüli kapcsolódásban játszik fontos szerepet (Sanchez- Ruiloba és mtsai, 2006). Emellett számos PDZ fehérjéről kimutatták, hogy mind a kinezinhez, mind a transzportálandó molekulákhoz tudnak kötődni, ezáltal szerepet játszanak a különböző transzport folyamatok szabályozásában (Kim and Sheng, 2004). Ezek alapján feltételezzük, hogy a vad típusú PKD az axonban a mikrotubulusok mentén, a kinezinhez - PDZ domént tartalmazó adaptor fehérjéken keresztül - kapcsolódva szállítódik, és hogy a kapcsolódáshoz a PKD aktivitására van szükség.

Annak alapján, hogy az érett hippokampális idegsejt-tenyészetekben a PKD konstrukciók a Golgi készüléknél felhalmozódást mutattak, és hogy magas endogén PKD aktivitás volt detektálható a Golgi készüléknél, feltételezzük, hogy a nem-neurális sejtekhez hasonlóan a PKD szerepet játszik a idegsejtek Golgi készülékének működésében is. Kísérleteink során a kdPKD1-EGFP expressziója a neuronális Golgi készülék feldarabolódásához vezetett. Ennek magyarázata lehet, hogy a kináz inaktív PKD túlermelgetése megzavarja a Golginál előforduló intenzív membrán dinamikát, vagy megváltoztatja a Golgi készülék fenntartásában fontos szerepet játszó citoskeletális rendszer szerkezetét. A mi megfigyeléseinkkel ellentétben a nem-neurális sejtekben a kdPKD1 expresszálása a TGN tubulizációját eredményezte, aminek általánosan elfogadott magyarázata az, hogy a kdPKD a Golgi készüléknél történő vezikulák lefűződését gátolja meg (Bard and Malhotra, 2006). A látszólagos ellentmondás magyarázata lehet az, hogy az idegsejtek és a nem-neurális sejtek a Golgi készülékük felépítésében és működésében alapvetően különböznek. Ezért annak ellenére, hogy különböző morfológiai változást látunk, eredményeink a következő pontokban egyeznek meg a nem-neurális sejteken végzett kísérletek eredményeivel: *i)* a sejtspecifikus Golgi struktúra fenntartásához szükség van a PKD aktivitására és *ii)* a PKD aktivitásának módosítása a Golgi készülék integritásának gyors változásához vezet.

Amellett, hogy a kdPKD1-EGFP expressziója megváltoztatta a Golgi készülék struktúráját, a dendritfa kiterjedésének nagymértékű csökkenését is okozta az érett idegsejtekben. Az erős korreláció, ami az elemzéseink alapján a Golgi apparátus szétesése és a dendritfa redukciójának mértéke között áll fenn, arra utal, hogy a dendritfa zsugorodása az elromlott szekréciós működés, és a következésképpen kialakuló csökkent membrán komponens ellátás eredményének következménye lehet. Nemrég megjelent közleményekben is hangsúlyozták a Golgi szerveződésének fontosságát a dendritfa arborizációjának fenntartásában (Horton és mtsai, 2005; Ye és mtsai, 2007). Mivel az endogén PKD aktivitása nemcsak a Golgi készüléknél, hanem a dendritek citoplazmájában is detektálható volt, feltételezzük, hogy a PKD a Golgi készüléknél kifejtett hatása mellett lokálisan is befolyásolhatja a dendritfa struktúráját. Egyik lehetőség, hogy a PKD az endoszómális rendszerre hatva szabályozza a dendritfa arborizációját, mivel nemrég megjelent adatok alapján a kináz inaktív PKD megnöveli a dendritikus membránfehérjék endocitózist (Bisbal és mtsai, 2008). Emellett ismert, hogy a PKD részt vesz a sejtváándorlás során fellépő citoskeletális szerveződés szabályozásában is (De Kimpe és mtsai, 2009; Scholz és mtsai, 2009), tehát a PKD a citoskeletális rendszer szabályozásán keresztül is kifejtheti hatását a dendritfa átrendeződésében.



### A dolgozat témakörében megjelent közlemény:

Czöndör K., Ellwanger K, Fuchs YF, Lutz S, Gulyás M, Mansuy IM, Hausser A, Pfizenmaier K, Schlett K. (2009) Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons, *Mol Biol Cell*. Apr;20(7):2108-20 if: 6.028

### A dolgozat témakörén kívül megjelent közlemények:

Tárnok K., Czírók A., Czöndör K., Schlett K. (2005) Cerebellar granule cells show age-dependent migratory differences in vitro, *J Neurobiology*, Nov;65(2):135-45. if: 4.17

Tárnok K., Czöndör K., Jelítai M., Czírók A., Schlett K. (2008) NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity, *J Neurochem*. Feb;104(3):818-29 if: 4.451

### Konferencia-részvételek:

Czöndör K. (2003) Funkcionális NMDA csatornák vizsgálata transzgenikus kisagyi szemcsesejt-tenyészetekben. **Biológus TDK**, poszter

Czöndör K., Tárnok K., Jelítai M., Czírók A., Schlett K. (2004) The effects of NR2B NMDA receptor subunit overexpression in cerebellar granule cell cultures. **IBRO International Workshop**, Budapest, poszter

Czöndör K., Czírók A., Jelítai M., Tárnok K., Schlett K. (2005) The effects of NR2B NMDA receptor subunit overexpression on the migration of cerebellar granule cells in vitro. **XI. MITT Kongresszus**, Pécs, poszter

Czöndör K. (2005) Az NMDA receptorok alegység-összetételének hatása kisagyi szemcsesejtek in vitro migrációjára. **XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia**, Pécs, előadás

Czöndör K., Borbély S., Urbán V., Uher F, Schlett K., Világi I. (2006) Multielectrode method for recording electrical activity of cultured cells. **IBRO International Workshop**, Budapest, poszter

Czöndör K., Hausser A., Schlett K. (2007) The role of PKD in neuronal transport processes: vesicular transport and altered morphology of transfected hippocampal neurons. **MITT Kongresszus**, Szeged, poszter

Czöndör K., Hausser A., Pfizenmaier K., Schlett K. (2008) Protein kinase D influences dendritic arborization and Golgi structure in transfected hippocampal neurons. **6<sup>th</sup> FENS kongresszus**, Genf, Svájc, poszter

Czöndör K., Hausser A., Pfizenmaier K., Schlett K. (2008) Protein kinase D influences dendritic arborization and Golgi structure in transfected hippocampal neurons. **PENS Synapse Summer School**, Bordeaux, Franciaország, poszter

Czöndör K., K. Ellwanger, S. Lutz, M. Gulyás, A. Hausser, K. Pfizenmaier, K. Schlett (2009) Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons **XII. MITT Kongresszus**, Budapest, poszter

## A tézisekben idézett irodalom

- Bard F, Malhotra V (2006) The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**:439-455.
- Bisbal M, Conde C, Donoso M, Bollati F, Sesma J, Quiroga S, Diaz Anel A, Malhotra V, Marzolo MP, Caceres A (2008) Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *J. Neurosci.* **28**:9297-9308.
- De Kimpe L, Janssens K, Derua R, Armacki M, Goicoechea S, Otey C, Waelkens E, Vandoninck S, Vandenheede JR, Seufferlein T, Van Lint J (2009) Characterization of cortactin as an in vivo protein kinase D substrate: interdependence of sites and potentiation by Src. *Cell. Signal.* **21**:253-263.
- Horton AC, Racz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD (2005) Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* **48**:757-771.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:771-781.
- Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V (2001) Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* **104**:409-420.
- Oster H, Abraham D, Leitges M (2006) Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns* **6**:400-408.
- Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenheede JR, Van Lint J (2003) Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett.* **546**:81-86.
- Sanchez-Ruiloba L, Cabrera-Poch N, Rodriguez-Martinez M, Lopez-Menendez C, Jean-Mairet RM, Higuero AM, Iglesias T (2006) Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J. Biol. Chem.* **281**:18888-18900.
- Scholz RP, Regner J, Theil A, Erlmann P, Holeiter G, Jahne R, Schmid S, Hausser A, Olayioye MA (2009) DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling. *J. Cell Sci.* **122**:92-102.
- Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T (2002) Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol.* **12**:193-200.
- Watkins JL, Lewandowski KT, Meek SE, Storz P, Tokar A, Piwnicka-Worms H (2008) Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:18378-18383.
- Ye B, Zhang Y, Song W, Younger SH, Jan LY, Jan YN (2007) Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* **130**:717-729.
- Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V (2004) Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* **6**:106-112.
- Yin DM, Huang YH, Zhu YB, Wang Y (2008) Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J. Neurosci.* **28**:8832-8843.